

EP

US

PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 9 6 0 5 4	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP96/02099	国際出願日 (日.月.年) 25.07.96	優先日 (日.月.年) 25.07.95	
出願人(氏名又は名称) 東レ株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

- ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
- ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
- ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
- 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

- 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
- 要約書とともに公表される図は、
 第__図とする。☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲7は、治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A 61 K 38/21, A 61 K 45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A 61 K 38/21, A 61 K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 62-12724, A (ペーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテルハフツング) 21. 1月. 1987 (21. 01. 87) & EP, 203580, A1 & US, 4921697 , A	1-6, 8
P, X	J P, 7-215893, A (森井浩世) 15. 8月. 1995 (15. 08. 95) (ファミリーなし)	1-6, 8
A	Calcified Tissue International, Vol.53 Suppl.1 (1993) G. David Roodman, "Role of Cytokines in the Regulation of Bone Resorption" S94-S98	1-6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 10. 96

国際調査報告の発送日

29.10.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一



4 C

9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gerontology, Vol. 35 (1989) Shunichi Shiozawa, et al., "Radioimmunoassay of Circulating Alpha-Interferon with Reference to Aging and Osteoporosis" , p. 305-310	1 - 6 , 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/21, 45/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/04799</p> <p>(43) 国際公開日 1997年2月13日(13.02.97)</p>		
<table border="1"><tr><td data-bbox="105 415 812 1087"><p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02099</p><p>(22) 国際出願日 1996年7月25日(25.07.96)</p><p>(30) 優先権データ 25 Mar 97 (30 mos.) 特願平7/188972 1995年7月25日(25.07.95) JP</p><p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p><p>(72) 発明者: および</p><p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井田亘隆(IDA, Nobutaka)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目4-17 Kanagawa, (JP) 鈴木知比古(SUZUKI, Tomohiko)(JP/JP) 〒215 神奈川県川崎市麻生区千代ヶ丘6丁目6-9 Kanagawa, (JP) 熊谷栄美(KUMAGAI, Emi)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP)</p></td><td data-bbox="812 415 1539 1087"><p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p><p>添付公開書類 国際調査報告書</p></td></tr></table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02099</p> <p>(22) 国際出願日 1996年7月25日(25.07.96)</p> <p>(30) 優先権データ 25 Mar 97 (30 mos.) 特願平7/188972 1995年7月25日(25.07.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井田亘隆(IDA, Nobutaka)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目4-17 Kanagawa, (JP) 鈴木知比古(SUZUKI, Tomohiko)(JP/JP) 〒215 神奈川県川崎市麻生区千代ヶ丘6丁目6-9 Kanagawa, (JP) 熊谷栄美(KUMAGAI, Emi)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02099</p> <p>(22) 国際出願日 1996年7月25日(25.07.96)</p> <p>(30) 優先権データ 25 Mar 97 (30 mos.) 特願平7/188972 1995年7月25日(25.07.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井田亘隆(IDA, Nobutaka)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目4-17 Kanagawa, (JP) 鈴木知比古(SUZUKI, Tomohiko)(JP/JP) 〒215 神奈川県川崎市麻生区千代ヶ丘6丁目6-9 Kanagawa, (JP) 熊谷栄美(KUMAGAI, Emi)(JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54)Title: REMEDY FOR BONE DISEASES</p> <p>(54)発明の名称 骨疾患治療薬</p> <p>(57) Abstract A useful remedy for bone diseases comprising β-interferon which has the effect of relatively promoting osteogenesis without showing any calcification insufficiency as observed in the case of γ-interferon. In particular, the preventive and therapeutic effects of β-interferon have been proved as an increase in the bone mass in a model animal with bone diseases. Also, an interferon inducer is potentially usable as a remedy for bone diseases.</p>				

(57) 要約

本発明により、 β 型インターフェロンの相対的な骨形成促進作用が明らかとなった。更に γ 型インターフェロンに見られるような石灰化不全作用は β 型では無く、特に、骨疾患モデル動物で予防および治療効果が骨量増加として実証された β 型インターフェロンの骨疾患治療薬としての有用性が示された。

またインターフェロン誘発物質においても骨疾患治療剤としての可能性を見出した。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バハマ	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GG	グンニグ	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TH	タイ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モロッコ	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CU	キューバ	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
				NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
				NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明 細 書

骨疾患治療薬

技術分野

本発明は β 型インターフェロンの骨疾患用医薬に関するものであり、物理的、代謝学的、悪性新生物的などさまざまな原因による骨疾患に対し、予防または治療薬として利用される。また、本発明にはインターフェロン産生誘発剤の骨疾患予防および治療における医薬用途も含まれる。

背景技術

骨は脊椎動物においてその体を支える重要な組織である。その見掛上のイメージとは異なり、骨は活発に主に破骨細胞による破壊と骨芽細胞による形成を繰り返しており、両作用の絶妙なバランスのもとにその形態と物理的強度の恒常性を維持している。このバランスが崩れると様々な骨疾患が生じ、近年では特に骨粗鬆症が医学的にも社会的にも大きな問題となっている（折茂 肇、小沢英浩、「目で見える骨粗鬆症」、メヂカルビュー社、1990）。骨粗鬆症は必ずしも骨吸収が異常に高い状態でのみ出現する疾患ではなく、例えば、骨吸収が低い状態であっても骨形成反応が更に低下した場合には出現する。骨粗鬆症には骨吸収および骨形成反応が共に盛んである高回転型、骨吸収および骨形成が共に低下している低回転型が存在する。前者はI型とも言われ閉経後の婦人に多発し、後者はII型とも称され男女を問わず老人に多発する。即ち、あくまでも骨形成反応と骨吸収反応の相対的バランスが重要であり、その結果が最終的に骨量、骨強度として反映される。従って、特に骨密度が低下する骨疾患に対しては骨形成速度を骨吸収速度に対して相対的に高めるか、骨吸収速度を骨形成速度に対して相対的に低下させる手段の適用が治療に有効であるとされている。

骨吸収過程では破骨細胞が、骨形成過程では骨芽細胞がその主役を果たしている（Baron, R., et al., Bone and Mineral Res., 2, 175-243, Elsevier, New York, 1984）。閉経あるいは老化と言った生理的原因以外にもこれらの細胞の増殖、

分化、機能発現に影響し、両者の相対的バランスを乱せば、その要因が物理的、化学的、生物学的、更に原因不明ないずれであっても、各種骨疾患を引き起こす。骨吸収および骨形成の相対的バランスを乱すものには、例えば、癌関連として肺癌、乳癌、腎癌の骨転移、多発性骨髄腫など、代謝性骨疾患として骨ペーজেット病、クル病、骨軟化症、大理石病、変形性関節炎、骨形成不全症など、ホルモン異常性関連として副腎皮質機能異常、副甲状腺機能異常に起因するもの、自己免疫異常による慢性関節リウマチ、その他歯周病に関連する歯槽骨疾患などがある。骨芽細胞は中胚葉に由来する未分化間葉系細胞から分化してくる単核の細胞である。実験動物の骨組織から分離、採取された骨芽細胞は *in vitro* でも分裂増殖する性質があることから多くの株化細胞も得られている。例えば、MC3T3-E1株 (Sudo, H. et al., J. Cell Biol., 96, 191, 1983)、ROS17/2 株、UMR106 株 (Fraser, J. D. et al., J. Biol. Chem., 263, 911, 1988)、RCT-3 株 (Hearth, J. K. et al., Endocrinology, 124, 3060, 1988) などがある。

破骨細胞は多核の大型細胞で (Wergedal, J. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134, 244, 1970, Clark, S. E. et al., J. Bone Mineral Res., 4, 399, 1989)、カルシトニンレセプターを有し (Warshawsky, H. D. et al., J. Cell Biol., 85, 682, 1980, Nicholson, G. C. et al., J. Clin. Invest., 78, 355, 1986)、骨吸収においては骨基質に含まれるカルシウムをイオン化して体液中に移行させる (Blair, H. C. et al., Science, 245, 855, 1989) などの特徴を持っている。破骨細胞は発生学的には骨髄細胞から分化し形成される。骨髄もしくは脾臓の単核細胞を活性型ビタミンD₃やプロスタグランジンE₂などの共存のもとに培養すると破骨細胞の基本的性格を発現する破骨細胞様細胞が形成されることが知られている (Takahashi, N. et al., Endocrinology, 122, 1373, 1988, Udagawa, N. et al., Endocrinology, 125, 1805, 1989)。

インターフェロン (以下「IFN」と略す) は抗ウイルス作用、抗腫瘍作用を始めとして様々な生理活性を示すタンパク質であり、現在その発見の経緯、構造、物理化学的性質の違いにより α 型、 β 型、 γ 型に分類されている。例えば、 α 型は主に白血球、リンパ芽球、NK細胞、B細胞など、 β 型は主に線維芽細胞、 γ 型は主にT細胞、NK細胞により産生される。いずれのIFNについても既に抗

腫瘍剤あるいは肝炎治療剤として市販され、ヒト臨床治療で使用されている。 α 型 I F N の骨代謝への関与として、骨粗鬆症患者に対する活性型ビタミン D 3 あるいはカルシトニンの投与は血液中 I F N - α レベルの増加をもたらす事から (Shiozawa, S. et al, Gerontol., 35, 305, 1989)、何らかの関係が示唆された (藤田拓男、Clinical Calcium, 2, 852, 1992)。In vitro ではヒト臍帯血を材料として各種ヒト遺伝子組み替え α 型 I F N による破骨細胞様細胞の形成阻害の報告がある (穴井恭市ら、日本骨代謝学会雑誌、9巻、238、1991)。更に、ヒト遺伝子組み替え α 型 I F N による C 型肝炎の治療を行った患者で治療前に比べ骨吸収の指標となる尿中デオキシピリジノリンの値が低下したり (吉田博昭ら、日本骨代謝学会雑誌、12巻、215、1994)、骨量が増加したとする報告 (川勝充ら、日本骨代謝学会雑誌、12巻、234、1994) がある一方で、ヒト遺伝子組み替え α 型 I F N 投与は C 型肝炎患者の骨量に全く影響を与えないとの否定的な報告もあり (田中俊博ら、日本消化器病学会雑誌、91巻、演題 0- 423、1994)、評価は混沌としている。この効果の有無に関する混沌とした状況は基礎研究レベルでもみられる。即ち、骨の器官培養系でもパラサイロイドホルモンで誘発した骨吸収をマウス I F N が阻害するとの in vitro 実験報告がある (Jilka, R. L. and Hamilton, J. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 553, 1984) 一方で、脱灰した骨マトリックスを皮下移植したマウスに対しマウス I F N を投与しても何等影響は無かったとの in vivo 実験報告もある (Nilsson, O. S. et al, J. Interferon Res., 4, 135, 1984)。これらの実験に用いられた I F N はいずれも α 型と β 型の混合物である。さらに、リウマチ様関節炎に対し α 型 I F N は全く無効との報告や (Kajandahl, A. et al., Lancet, Vol. i, 984, 1979)、さらには、I F N は実験滑膜炎を惹起させ、ヒトでは自家免疫病を誘発するとするマイナス面を主張する報告 (Rosenbach, T.O. et al., Clin. Rheumatol., 3, 361-364, 1984) さえある。従って、I F N 自体の評価が定まっていない事に加え、 β 型 I F N 単独での作用の有無については全く判明していない。

I F N の骨代謝に及ぼす作用の有無が曖昧であった原因の少なからざる部分は I F N の持つ種特異性という特性によっている。特に β 型 I F N では α 型 I F N と異なり種特異性が強い。すなわち、 β 型 I F N 試験の正当な評価は本来その動

物種に対応した動物の β 型 I F Nで行わねばならない。前述したように骨量の増減はあくまでも骨形成系と骨吸収系への作用の相対的強弱で最終的に決定されるので、 β 型の骨に対する正当な評価は対応する動物種の I F N- β を用い、且つ厳密に、科学的にコントロールされた骨吸収系および骨形成系での比較実験で初めて可能になる。本発明者らの主張は、骨疾患分野の医薬の発明を完成させる上で、骨形成系と骨吸収系双方での相対評価が極めて重要な必須条件であるという点にある。この主張の正当性は、下記 γ 型 I F Nの例示でより明確、具体的に示すことが出来る。

I F Nの骨代謝に及ぼす影響に関しては γ 型に関する報告が最も多い。その多くはTakahashi らの確立した骨髄細胞からの破骨細胞様細胞の形成の実験系に於て、ブラジキニン (Lerner, U. H. et al, Agents and Actions, 32, 305, 1991)、フォルスコリン、コレラトキシン (Lerner, U. H. et al, J. Bone Min. Res., 6, 551, 1991)、インターロイキン 1 (Foffmann, O. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 38, 1987)、あるいは活性型ビタミン D 3 (Gowen, M. et al, J. Bone Min. Res., 1, 469, 1986) 刺激による形成が阻害される事実によって示されてきている。これらの報告に先立ち、 γ 型 I F Nの骨調節作用特許が既に提示されている (マインラット ペテルリック、特願昭61- 123862)。骨吸収系でのみ評価たれりとするなら、破骨細胞が骨吸収をするのでこの形成を抑制すれば骨量減少は抑制されるか、停止するかあるいは増加に転じるはずなので、 γ 型 I F Nの骨量改善薬としての発明が完成したとみなされたり、容易にその効果が推定されるということにもなりがちである。しかし、実体は全く逆であった。サイクロスポリン A投与で誘起される実験動物のオステオペニア (osteopenia とは骨のカルシウム沈着もしくは密度の減少 ; ステッドマン医学大事典、改訂第2版、メジカルビュー社、1988) に対し、I F N- γ 投与は改善効果がなく、むしろ骨減少を引き起こす事実とその理由が骨塩沈着の抑制であろうとの示唆が報告された (Mann, G. N. et al, Endocrinology, 135, 1077, 1994)。さらに、あろう事かその後の研究によって、破骨細胞形成による骨吸収促進や活性化が治療や症状改善に必要とされる骨大理石病に対し強力な破骨細胞形成阻害能を有する γ 型 I F Nが極めて優れた治療効果を動物 (Rodriguiz,

R.M. et al., Pediatrics Res., 33, 384, 1993) およびヒト (Lyndon Key, Jr. L. et al., NewEngl. J. Med., 332, 1544, 1995) の両方で発揮したという皮肉な顛末に至っている。

すなわち、I F Nの骨治療薬、特に骨量増加を必要とする骨疾患治療薬としての意義は単に当該医薬あるいは物質が示す骨吸収抑制作用のみでは不完全で、少なくとも骨形成系（骨芽細胞の増殖、分化、石灰化）全体に対し抑制が無い、軽微であること、より好ましくは逆に骨形成系に対しては活性化作用のある事が証明されて初めて発明は完成される。実際に以下の課題の解決によりマウス I F N投与はマウス骨形成には何等効果が無いとする前述のNilsson ら (J. Interferon Res., 4, 135, 1984) の主張とは全く逆の結論に本発明者らは到達する事が出来た。即ち、骨疾患モデル動物で一旦失われた骨量を回復させる骨形成促進効果の実証により本発明を完成させた。

発明の開示

本発明は、従来の物質的な曖昧さを解決し、かつ厳密にコントロールされた骨吸収系および骨形成系での相対評価から骨形成作用の有無を明らかにし、 β 型 I F Nを産業上および医療上有用な骨疾患の予防および治療薬として提供し、さらに本発明に至った発見の諸事実から α 型、 β 型あるいは γ 型 I F N誘発物質を骨疾患の予防および治療薬として医療の場に提供することになる。

図面の簡単な説明

第1図は、破骨細胞様細胞の形成に対するマウス β 型、 γ 型 I F Nの阻害作用を示す骨髓細胞はddY系マウス由来である。

第2図は、破骨細胞様細胞の形成に対するマウス β 型 γ 型 I F Nの阻害作用を示す。骨髓細胞はC 57 BL/6系マウス由来である。

第3図は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の増殖に対するマウス β 型、 γ 型 I F Nの作用を示す。

第4図は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化に対するマウス β 型、 γ 型 I F N間の作用の違いを示す。

第5図は、マウス I F N で処理したマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化巣から抽出したカルシウム量を示す。

第6図は、マウス I F N で処理したマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化巣から抽出した無機リン量を示す。

第7図は、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株におけるマウス β 型 I F N の頻回投与による石灰化促進効果を示す。

第8図は、卵巣摘出で減少したマウス骨量のマウス I F N - β 投与による回復効果を示す。

第9図は、卵巣摘出で増大した骨吸収に対するマウス I F N - β 投与による抑制効果を示す。

第10図は、マウス I F N - β 投与実験中のマウスの体重変化を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、先ず物質的な曖昧さを排する手段として高度に精製されたマウス I F N を用いた。遺伝子操作技術による大量生産、精製はその目的のための良い一つの方法であり、それぞれ詳細な報告（マウス I F N - α : Shaw, G. D. et al., Nucleic Acids Research, 11, 556-573, 1982、マウス I F N - β : Higashi, Y., et al., J. Biol. Chem., 258, 9522, 1983, Senda, T. et al, Proc. Japan Acad., 66, Ser. B, 77, 1990 : マウス I F N - γ : Gray, P. W. and Goeddel, D. V., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 5842, 1983）がある。勿論充分なレベルまでに精製されたものであれば天然型のマウス I F N を用いても何ら問題はない。本発明における実施例中では、マウス I F N - α は市販品（Lot .B13010 10^6 units / ml / vial, Calbiochem-Novabiochem International, San Diego, CA）を用いた。マウス I F N - γ はLot 254F3, 2.06×10^6 units/mlの標品で Genentech, San Francisco, CA より提供されたものを用いた。マウス I F N - β は、Lot M-0034, 10^7 units / ml / vialの当社で調製した標品を使用した。該マウス I F N - β の遺伝子組み替えによる大腸菌での生産方法、精製方法については既に詳細に報告されている（Tanaka, T. et al., J. Interferon Res., 6, 429, 1986, Matsuda, S. et al., J. Interferon Res., 6, 519, 1986）。

また、すでにこれらと同等の高純度マウス I F N が他のメーカー（例えば、Hyclone biotechnology 社、Paesel GmbH 社、Cosmo Bio 社、Genzyme 社）からも市販されているのでこれらを用いても良い。

生物学的評価の曖昧さの解決手段としては、同一動物種さらに同系統動物に由来する骨形成系細胞および骨吸収系細胞に対する相対活性を定量的に扱い、従来法による評価の欠点解消を計った。すなわち、同種実験動物であっても、その系統により各種ホルモンへの反応性が大きく変化することから、骨吸収系-骨形成系への相対効力も同系統で検討する必要がある。例えば、I 型骨粗鬆症のモデルとしてマウスから卵巣摘出を行う場合にも骨量減少率に関してマウスに系統差が明確に存在することが知られている（保坂努ら、アニテックス、5巻、243、1992）。そこで、本発明者らは、高純度のマウス I F N を用い、かつ同系統のマウスに由来する骨形成系を担う骨芽細胞系と、骨吸収系を担う破骨細胞系への作用を厳密かつ定量的に比較した。

その結果、 β 型 I F N は破骨細胞形成を極めて強力に阻害する。その一方で、 β 型 I F N は骨芽細胞系に対しては増殖能、分化能、石灰化能のいずれをも殆ど阻害しないばかりでなく、条件によっては石灰化をむしろ促進する事を初めて明らかにし本発明を完成した。本発明者らは、 γ 型 I F N の強力な破骨細胞形成阻害を追認した。しかしその一方で、 γ 型 I F N は骨形成系においては石灰化を強力に阻害することを骨芽細胞のみより成る単純な *in vitro* レベルで初めて明らかにした。この成績は既に紹介した *in vivo* レベルでの γ 型 I F N による石灰化不全の類骨形成の成績（Mann, G. N. et al, *Endocrinology*, 135, 1077, 1994）を良く説明する。即ち、硬組織としての骨組織の完成に石灰化は必須のプロセスであり、 γ 型 I F N に比べ β 型 I F N の性質は骨量改善に極めて好ましいものであることを証明して本発明は完成された。

β 型 I F N の強力な破骨細胞形成阻害は腫瘍関連の骨疾患、例えば乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、腎癌、大腸癌、消化器癌、食道癌などの骨転移（Stoll, B. A., *Bone Metastasis: Monitoring and Treatment*, Raven Press, N.Y., 1983）に対し予防および治療薬として有効に用いる事は発明者自身が当然にも認識している事である。すなわち、腫瘍の骨転移巣の形成、進展には破骨細胞の増

数、活性化が密接に関わっているからである (Galasco, C. B. S., Skeletal Metastases, Butterworths, pp 22- 51, 1986)。従って、当然ながら、 β 型 I F N は腫瘍に随伴する高カルシウム血症 (腫瘍関連骨疾患の一態様) の治療にも有効に用い得る。本発明に於いて、I F N が in vitro で強力に破骨細胞形成を抑制し、一方で骨形成系細胞の増殖、分化、石灰化を支障無く進行させ、条件によっては石灰化を促進させる事実、更に in vivo 骨粗しょう症モデル動物では骨吸収を抑制すると共に、一旦低下した骨量を増加させる事実は骨吸収系と骨形成系の両者での相対評価が必須であることを明らかに示すものである。骨吸収系に対する抑制効果が如何に強力であっても、そのみでは骨量改善を約束するものでない事は本発明中の I F N- γ での実験例および既に紹介した文献報告成績 (Mann, G. N. et al, Endocrinology, 135, 1077, 1994) が明らかに物語っている。すなわち、I F N の骨吸収阻害作用を発見しても骨形成系への作用が明らかにされていなければ骨疾患予防あるいは治療薬としての発明は未完成である。

その曖昧さは本発明の in vitro 試験において初めて解決され in vivo 試験での実証により発明としての完成に至った。更に、 β 型 I F N が生体を相対的に骨形成へと向かわせ、しかもその作用は骨量が正常値範囲にある生体より異常値範囲 (例えば本発明の実施例の閉経後骨粗鬆症モデルにおける卵巣摘出マウス) にある生体で明瞭に現れた。即ち、本発明の実施例に示した様に、卵巣摘出で骨粗鬆状態になったマウスにおいて 10^3 units / 頭 / 回の用量の I F N- β 処置では骨量減少予防効果が示された。一方、偽手術群に於ても I F N- β 投与による尿中デオキシピリジノリン (以下「D-Pyr」と略す。) 排出抑制作用 (骨吸収抑制作用) が発現しているが、それが直ちに当該マウスの著しい骨量増加をもたらしてはいない。これは骨代謝におけるホメオスターシスの発動により、いたずらな骨量増加、例えば骨大理石病のような状態に至らないように調節されているのかも知れない。事実、その乾燥骨重量は対照群である生理食塩水投与群のそれと同レベルであった。即ち、I F N- β による骨量増加効果は正常骨量レベルにある個体よりも低骨量 (疾患、ホメオスターシスが乱れた) 状態にある個体に対しより有効に発現する事を実証出来たのである。

これらの事実は、 β 型 I F N が代謝性骨疾患、ホルモン異常性骨疾患、骨粗鬆

症、骨折、歯槽骨疾患など骨組織全体であるいは部分的に異常骨量値を示す骨疾患の両者に対して予防的あるいは治療的な医薬として極めて有用である事も明らかに示すものである。本発明にある I F N の効果からは I F N をヒト以外の動物の骨疾患にも用いる事が出来ることは明らかである。但し、I F N が有する種特異性からは該動物種に対応する I F N であることが好ましい。近年、イヌやネコなどのコンパニオンアニマルの飼育環境は著しく改善され動物医療の現場での医療技術の高度化、バランスのとれた動物用食品の普及が進んでいる。その結果、コンパニオンアニマルも急速な高齢化社会を迎えている。これらの高齢化動物の示す歯科領域も含む多様な骨疾患の発現は驚くほどヒトのそれらに似ている。即ち、各種動物 I F N は対応する動物種の代謝性骨疾患、ホルモン異常性骨疾患、骨粗鬆症、骨折、歯槽骨疾患などの予防および治療に用いることが出来る。

本発明に用いられる I F N は、 β 型、あるいは β 型のアミノ酸配列を含むコンセンサス型や、ハイブリッド型のいずれでもよく、また由来も天然型、遺伝子組換え型、化学合成のいずれでもよい。

天然型インターフェロン β の生産では線維芽細胞およびその樹立株化細胞が好んで用いられる。遺伝子組換え型技術を利用してインターフェロンを調製する場合には、宿主細胞として、CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞、マウス C 1 2 7 細胞などの哺乳動物細胞、カイコ、夜盗蛾などの昆虫細胞、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物などを用いることができる。さらに、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシなどを用いることができる。

この様にして調製されたインターフェロン β は、原料となる細胞培養上清、虫体抽出液、菌抽出液、生体抽出液から種々のクロマトグラフィーにより、精製分離することができる。用いるクロマトグラフィーは、インターフェロン β に親和性を有するものであればいずれでも良いが、例えば、二酸化ケイ素 (シリカ) やリン酸カルシウムを吸着素材とするカラム、ヘパリンや色素や疎水量をリガンドとするカラム、金属キレートカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどである。

更に、本発明は骨疾患治療薬探索、評価の新規な方法を提供する。すなわち、従来の方法は試験物質を *in vitro* で骨芽細胞系細胞や破骨細胞 (あるいは破骨

細胞形成系統の細胞)に添加し、それぞれ骨形成能や骨吸収能を評価する方法であった。同様に *in vivo* においては動物に試験物質を投与して骨量を測定する手法が用いられている。これらは直接的な方法ではあるが多数の試験検体評価には時間も費用もかかる。一方、本発明の方法では骨疾患治療剤となるか否かの一次評価は、該検体の I F N 産生能をまず *in vitro* ついで *in vivo* で測定するという簡便な手段ですむ。また方法論的には間接的な手法であり、従来の直接法とは異なる。評価尺度の第 1 は産生される I F N の絶対量の多少であり、第 2 は骨吸収促進活性を示す他のサイトカイン、リンホカイン (例えば、インターロイキン 1、インターロイキン 6 等) との相対産生量の比である。すなわち、I F N inducer を対象とした骨疾患治療薬探索においても相対活性概念の重要性を本発明者らは主張する。候補物質選択の第 1 及び第 2 の尺度の具体的数値は、2 次評価に採用する試験系によって決定される。*In vitro* で I F N 産生能評価に用いられる細胞は公知のいずれの細胞であってもよく、骨組織由来細胞も好ましく利用される。産生 I F N 及び他のサイトカイン、リンホカインの測定はバイオアッセイ、E I A, R I A など公知のいずれの方法によってもよい。

本発明により得られる I F N はそのみで医薬用途に用いてよいが、医薬品として容認し得る担体や医薬添加物を含んでいてもよい。例としては、水、生理食塩水、リンガー液、ハanks液、およびグルコース液、ラクトース、デキストロース、エタノール、グリセロール、アルブミンなどの溶液を含む、非経口的投与に適した殆どのキャリアーが含まれる。これらの組成物は、安定化剤、抗酸化剤、抗菌剤、防腐剤、緩衝剤、界面活性剤および他の付属の添加剤を必要に応じて含み得る。また、I F N 投与により生ずる発熱等のいわゆるインフルエンザ様症状の予防あるいは抑制のために抗炎症剤を I F N 製剤中に含有させることができる。実際の添加物は本発明が対象とする疾患の予防あるいは治療剤の剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

投与方法としては特に限定されるものではない。本発明の治療対象疾患に応じて投与方法が適宜選択される。経口的、および／または、皮下、筋肉内、腹腔内、経腔的、経直腸的あるいは静脈内注射を含む非経口的に全身的に、ならびに／あ

るいは、経鼻的に／あるいは経肺的に投与され得る。また、浸透圧ポンプ（例えば、alzet osmotic pump, Alzet Corporation, Palo Alto, CA）など体内留置型の徐放方式に適した製剤も本発明の対象とする疾患により選択され得る。

経鼻的にあるいは経肺的な投与方法に於ては微少液滴あるいは微少粉体を作り出す医学的に許容された適当なデバイスの利用と共に液状剤型あるいは粉体剤型が選択され得る。また、本発明による I F N は局所適応剤型としても利用される。例えば、注入、あるいは、持続放出型キャリアーの外科手術的埋め込みが治療部位に直接行われ得る。これらキャリアーとしてはヒドロゲル類、ポリ乳酸、およびコラーゲンマトリックス類が含まれる。コラーゲンマトリックス類としてはヒト以外の動物由来のコラーゲンを利用する場合はキャリアー自体の抗原性を消去したアテロコラーゲン（例えば、Zyderm, Collagen Corp., Palo Alto, CA）の利用が好ましい。また、整形外科、歯科領域に於て骨局所の再建に利用されるヒドロキシアパタイトカルシウムホスフェート（例えば、HA-TCP, Zimmer Inc., Warsaw, IN）も適当なキャリアーとして用い得る。さらに、投与法に応じて発熱等のいわゆるインフルエンザ様症状の発生が予想されたり発生した場合には、予防あるいは症状の緩解の為に抗炎症剤を併用することはなんら問題ない。

本発明の I F N の正確な投与量は、被検体の年齢、体重、性別、および疾患の種類、特性、症状のステージなどにより変化する。従って、正確な投与量は前以て特定され得ず、治療する者によって決定される。しかしながら、適切な量はおよそ全身治療としてはヒト 1 日投与量として約 1 万 units から約 1000 万 units の間にある。局所投与のための有効量は 1 万 units から約 300 万 units の間にある。

さらに、本発明者らは得られた実験的諸事実に関し研究を行った結果、 α 型、 β 型または γ 型インターフェロン誘発物質（以下、「I F N inducer」と称する）に従来知られていなかった、それが低分子物質、高分子物質のいずれであるかを問わず、骨疾患予防薬および治療薬としてのポテンシャルのあることを明らかに出来た。骨疾患治療薬として用いることが出来る I F N inducer としては、例えば既に市販されている OK-432（Saito, M. et al., Cell Immunol., 68, 187, 1982）や P S K（Tsuru, S. et al., Cancer Immunol. Immunother.,

22, 114, 1986)、レバミゾール (Matsubara, S. et al., Cellular Immunol., 43, 214, 1979) と言った医薬の他に、各種低毒性の生ウイルス、不活化ウイルス、低毒性の菌体の培養上清や菌体処理物 (例えば、Izumi, S. et al., Cancer Res., 46, 1960, 1986、原 秀樹ら, Biotherapy 3, 1607, 1989、高橋 哲ら、第44回日本癌学会総会記事, 153 頁, 1985、日本国特許第1041679、日本国特許第863592、日本国特許第1287243、日本国特許第988498、日本国特許第1151765、日本国特許第1114570)、天然あるいは人工的に合成したリボ核酸およびそれらの誘導体、複合体 (例えば、日本国特許第1139721、日本国特許第877116、日本国特許第1113637、特開平2-111723、特開昭59-93097)、植物あるいはグリチルリチンのような植物由来物質 (例えば、漆崎一郎、堀越 茂編、「癌とBRM」、187-188頁、サイエンスフォーラム、1982、日本国特許第1281580、日本国特許第1681643、日本国特許第1288021、特開平4-77431)、有機ゲルマニウム化合物 (例えば、特開平7-247296、日本国特許第1661336、日本国特許第1418821、特開昭58-18395)、酪酸などの直鎖低級飽和カルボン酸、脂肪および脂肪酸化合物 (例えば、特開平7-31495、日本国特許第1701933、特開平2-78623)、ペプチドもしくはタンパク質 (例えば、特開平4-51892、特開昭59-222422、特開昭59-27832、特開昭58-15923)、ピリミジノール化合物 (例えば、日本国特許第1905169)、多糖類 (例えば、日本国特許第1643537、日本国特許第1449562、日本国特許第1393449)、ジピリダモール化合物 (例えば、特開昭58-170715)、カルバミルピペラジン化合物 (日本国特許第1290606)、イミキモド (例えば、Sidky, Y. A. et al., Cancer Res., 52, 3528, 1992)、放線菌およびその培養産物 (例えば、特開昭57-58630) などがあげられるが、これらに限定されるものではない。生体内に投与した場合にインターフェロン産生誘発能があるものであればよい (小林茂保、「増補版インターフェロン」、3章、19頁、講談社サイエンティフィク、1978)。本発明にあるIFN inducer はそのみで医薬用途に用いてよいが、医薬品として容認し得る担体や医薬添加物を含んでいてもよい。たとえば、水、生理食塩水、リンガー液、ハンクス液、およびグルコース液、ラクトース、デキストロース、エタノール、グリセロール、アルブミンなどの溶液を含む、非経口的投与に適した殆どのキャリアーが含まれる。これらの組成物は、安定化剤、抗

酸化剤、抗菌剤、防腐剤、緩衝剤、界面活性剤および他の付属の添加剤を必要に応じて含み得る。投与方法としては特に限定されるものではない。本発明の治療対象疾患に応じて投与方法が適宜選択される。経口的、および／または、皮下、筋肉内、腹腔内、経腔的、経直腸的あるいは静脈内注射を含む非経口的に全身的に、ならびに／あるいは、経鼻的に／あるいは経肺的に投与され得る。また、浸透圧ポンプ（例えば、alzet osmotic pump）など体内留置型の徐放方式に適した製剤も本発明の対象とする疾患により選択され得る。経鼻的に／あるいは経肺的な投与方法に於ては微少液滴あるいは微少粉体を作り出す医学的に許容された適当なデバイスの利用と共に液状剤型あるいは粉体剤型が選択され得る。

また、本発明による I F N inducer は局所適応剤型としても利用される。例えば、注入、あるいは、持続放出型キャリアーの外科手術的埋め込みが治療部位に直接行われ得る。これらキャリアーとしてはヒドロゲル類、ポリ乳酸、およびコラーゲンマトリックス類が含まれる。コラーゲンマトリックス類としてはヒト以外の動物由来のコラーゲンを利用する場合はキャリアー自体の抗原性を消去したアテロコラーゲン（例えば、Zyderm, Collagen Corp., Palo Alto, CA）の利用が好ましい。また、整形外科、歯科領域に於て骨局所の再建に利用されるヒドロキシアパタイトカルシウムホスフェート（例えば、HA-TCP, Zimmer Inc., Warsaw, IN）も適当なキャリアーとして用い得る。

さらに、投与方法に応じて発熱等のいわゆるインフルエンザ様症状の発生が予想されたり発生した場合には、予防あるいは症状の緩解の為に抗炎症剤を I F N inducer の投与前、投与中、投与後あるいはこれらを組み合わせて併用することはなんら問題ない。併用方法、投与量の設定は、骨疾患患者の年齢、体重、性別、および疾患の種類、特性、症状のステージなどを考慮し、治療を担当する物によって決定される。I F N 自体に発熱作用のあることが既に分かっていることから抗炎症剤を骨疾患治療薬としての I F N inducer 製剤中の構成成分とする事も極めて有用である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づき、より具体的に説明する。但し、下記実施例は例

示のためにのみ示すものであり、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

ddY 系統マウスの破骨細胞様細胞形成への作用：

1) 骨髓細胞の調製法および培養法

高橋らの方法 (Takahashi, N. et al., Endocrinology, 122, 1373, 1988) に従い骨髓細胞を調製した。7 週齢の ddY 系の雄マウスをエーテル麻酔下、放血死させ後肢の大腿骨および頸骨を採取。骨表面の結合織を丁寧に除去し、骨両端をハサミで切り落とした。25G 針を付けたシリンジを用い、10% 初乳前子牛血清 (三菱化成、以下「JCS」と略す。) 添加 α -MEM 培地 (日水製薬) で骨髓細胞をフラッシュアウトし遠沈管に集め、上記培地で 2000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心洗浄。沈澱細胞を上記培地で分散させ、さらに 2 回遠心洗浄操作を繰り返してマウス骨髓細胞を調製した。マウス IFN- α (以下「MuIFN- α 」と略す。)、Lot .B13010 10^6 units /ml /vial (Calbiochem-Novabiochem International, San Diego, CA)、マウス IFN- β (以下「MuIFN- β 」と略す。)、Lot M-0034, 10^7 units /ml /vial (当社品)、マウス IFN- γ (以下「MuIFN- γ 」と略す。)、Lot 254F3, 2.06×10^6 units /ml (Genentech、CA) は 10% JCS 加 α -MEM 培地 (日水製薬) にて目的の IFN 濃度とした。活性型ビタミン D3 (1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3、和光純薬、以下「Vit D3」と略す。) はアルゴン置換エタノールに溶解、希釈し全ての培養系内でのエタノールの最終濃度は 0.1 % に調整した。

2) 破骨細胞形成能の評価トリパンプルーで上記骨髓細胞の生細胞数をカウント、10% JCS, 10^{-8} M Vit D3, 10^{-7} M デキサメサゾン添加 α -MEM で 1.5×10^6 個/ml になるように希釈し、24穴プレートの各ウェルに 0.45 ml ずつ蒔いた。各濃度のマウス IFN を含む培地を 50 μ l 追加、合計液量を 0.5 ml /ウェルして培養を開始した。3 日毎に 0.4 ml の旧培地を抜取り、新鮮培地 (各濃度 IFN を含む上記培地) を 0.4 ml 追加し培養 8 日目に培地を除き細胞をエチルアルコール、エーテル濃度 (1 : 1) で固定、酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞を位相差顕微鏡でカウントした。第 1 図は、この結果を示したものであり、各本系に添加した MuIFN- β および γ はいず

れも強力に破骨細胞様細胞の形成を阻害した。図中の各カラムは4例の平均値および標準誤差で示してある。マウス I F N 添加量を変えると明らかな用量依存性が両 I F N で認められたが、その効果は γ 型の方が β 型より強力で γ 型の抑制濃度 I C₅₀ は 0.1 units /ml 以下、 β 型のそれは 0.2 units /ml であった。

実施例 2

C 57 BL/6 系統マウスの破骨細胞様細胞形成への作用：

ddY 系マウスに代え、7 週齢の C 57 BL/6 系の雄マウスを用いた。エーテル麻酔下、放血死させ後肢の femur および tibia を採取。骨表面の結合織を丁寧に除去し、骨両端をハサミで切り離した。25G 針を付けたシリンジを用い、10% J C S 添加 α -M E M で骨髓細胞をフラッシュアウトし遠沈管に集め上記培地で 200 0rpm, 4℃で5分間遠心洗浄。沈澱した細胞を上記培地で分散させ、さらに2回遠心洗浄操作を繰り返し、実施例1の方法に従い破骨細胞様細胞形成を測定した結果、ddY 系マウスでの場合と同様に Mu I F N- β および- γ はいずれも強力に C 57 BL/6 系マウス骨髓細胞からの破骨細胞様細胞の形成を阻害した。第2図は、この結果を示したものであり、各本系に添加した Mu I F N- β および- γ による破骨細胞様細胞の形成阻害の I C₅₀ 値はそれぞれ 0.1 units /ml および 1.5 units /ml である。図中の各カラムは4例の平均値および標準誤差で示してある。

実施例 3

マウス骨芽細胞の増殖に対する作用 (in vitro 単回投与)：

C 57 BL/6 マウス起源であるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (児玉ら、Jap. J. Oral Biol., 23, 899, 1982) を P B S (-) で洗浄後、0.1% プロナーゼ (アクチナーゼ E, 科研製薬) を溶解した P B S (-) で保温剥離し、10% J C S、50ug/ml の L-アスコルビン酸 (ASA) 加 α -M E M にて 10,000 個/ml に分散。細胞増殖能に対する評価は MC3T3-E1 細胞を 24 穴プレート (Corning) の各 well に 5,000 個/ml ずつ蒔いた。ついで各 I F N 希釈液を 0.1ml /well ずつ添加し培養開始。Day 2 に培地を除去し、あらたに各 I F N 希釈液を 0.5 ml /well で添加 (液総量；0.5ml /well)。Day 6 に培地除去、P B S (-) 洗浄後、0.1% プロナーゼ 0.1% コラゲナーゼ混合酵素液を 200 μ l /well 添加し 37℃、15分反応。ついで、300 μ l /well の 10% 牛胎児血清 (Gibco、以下「F C S」と略す。) 加 α -M E

M培地を添加して分散、コールターカウンターにて細胞数を測定した。

細胞増殖に対する作用を図3に示す。各カラムとも4例の平均値および標準誤差で表示してある。両マウスIFNともMC3T3-E1細胞増殖に対する阻害作用は極めて弱いか、ほとんど無かった。MuIFN- γ で若干の増殖抑制が1 units /ml から認められるものの用量依存性に乏しく、10,000 units /ml という高濃度であっても30%程度の抑制に留まった。一方、MuIFN- β では10,000 units /ml でも全く抑制の気配がなかった。

実施例4

マウス骨芽細胞の分化能、石灰化に対する作用 (in vitro 単回投与) :

分化能評価のパラメーターとしてはアルカリホスファターゼ (ALPase) および石灰化で評価した。骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼの検出は培養開始後day 8に染色法で行った。石灰化判定はMC3T3-E1細胞を24穴プレートの各wellに50,000個/ml (実施例3の抗細胞試験の10倍量) ずつ細胞を蒔き、day 4に細胞が十分にコンフルエントに達していることを確認の上、培地を捨て、新たに0.9 ml /well の10% JCS、50 μ g /ml のL-アスコルビン酸、10 mM β -グリセロリン酸加 α -MEMを添加し、次いで各濃度のインターフェロン含有培地を0.1 ml /well 添加、4日後に培養液をIFN不含培地に置き換え、さらに4日毎に同様のIFN不含培地による培地交換を実施、day 14にVon Kossa 染色を行い石灰化巣を視覚化した。分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性の発現は次の石灰化への必須のステップであるが両マウスIFN共この分化マーカーである酵素活性の発現を阻害しなかった。

一方、第4図に示すように石灰化プロセスではMuIFN- β とMuIFN- γ で大きな違いが現れた。すなわち、 β 型が存在しても石灰化は重大な影響を受けずに進行するのに対し、 γ 型は用量依存的で強力な石灰化阻害作用を示しその効果はわずか10 units /ml という微量添加で出現し、石灰化阻害のIC₅₀値は約3-4 units /ml であった。硬組織としての骨組織が完全に修復されるためには、このMuIFN- γ の石灰化阻害は好ましくないのは言うまでもなく、 β 型の優位性は明らかである。

実施例5

マウス骨芽細胞MC3T3-E1石灰化巣のカルシウムおよび無機リンの定量：

MC3T3-E1細胞を24穴プレートの各wellに50,000個/mlで蒔き、コンフルエントに達するまで増殖後、培地を除き新たに0.9 ml/wellの10% JCS、50 μ g/mlのL-アスコルビン酸、10 mM β -グリセロリン酸加 α -MEMを添加し、次いで各濃度のIFN含有培地を0.1 ml/well添加、4日毎にIFN不含培地で培地を交換し培養を継続した。day 14に培地を除去、ハンクス液で軽く洗浄、無水エタノールを1 ml/wellで添加し室温にて15分間固定後、さらに新鮮無水エタノール1 ml/wellに置換し5分処理後室温で風乾。1 Nの塩酸を1 ml/well添加し室温で30分間抽出。全量をエッペンドルフチューブに移し1,800 x g、4℃、10分遠心後上清のカルシウム量をカルシウムCテストワコー、無機リン量をホスファBテストワコーで測定した。 β 型IFN添加でも若干のカルシウム沈着の抑制が見られたが、その程度は弱く1,000 units/mlでも対照に比べ20%減にとどまった。一方、 γ 型IFNは用量依存的で強力な石灰化阻害作用を示し、1,000 units/mlでは対照に比べ70%減に達し、IC₅₀値は約10 units/mlと低濃度であった（第5図）。図中の各点は4例の平均値および標準誤差である。

さらに、石灰化巣から抽出された無機リン量は図6に示す。図中の各点は4例の平均値である。抽出された無機リン量はカルシウム量と良い相関を示し、 β 型IFN1,000 units/ml処理でも対照に比べなお約20%減にとどまり、IC₅₀値は得られない。一方、 γ 型IFN1,000 units/ml処理では約80%減となり、そのIC₅₀値は約10 units/mlで極めて低濃度で出現する（第6図）。

実施例6

マウス骨芽細胞の分化能、石灰化に対する作用（in vitro 複数回投与）：

MC3T3-E1細胞を24穴プレートの各wellに30,000個/mlずつ蒔き細胞がコンフルエントに達した後、培地を捨て、新たに0.9 ml/wellの10% JCS、50 μ g/mlのL-アスコルビン酸、10 mM β -グリセロリン酸加 α -MEMを添加し、次いで各濃度のIFN含有培地を0.1 ml/well添加、その後の4日毎の培地交換は全て各濃度のIFN含有培地で行った。最初のIFN処理日から9日目にVon Kossa染色を行い石灰化巣を視覚化した。その結果、単回投与と異なり、I

IFNの2回投与により石灰化巣の数と染色強度は添加IFNの用量に応じ明らかに増加した（第7図）。

実施例7

骨粗鬆症モデルマウスに対するマウスIFN- β の治療効果：

8週令の雌ddy系マウスを5群に分け実験を行った。3群に両側の卵巢摘出手術を行い、2群は偽手術のみを行った。その後1カ月間正常食で飼育し、卵巢摘出群に骨粗しょう症状態を作りだした。本モデルにおいては卵巢摘出後2～3週目で骨粗鬆状態になる事が知られている（保坂努ら、アニテックス、5巻、243、1992、Miyaura, C. et al., J. Bone Mineral Res., 10, 1365, 1995）。術後3週目からマウスIFNの皮下投与（100 μ l /頭/回）を1日1回、計25回行い、投与開始30日目にエーテル麻酔下、体重測定、採血を行ない、大腿骨を採取し乾燥骨重量を測定した。

大腿骨の乾燥は以下のように行った。摘出大腿骨1本当たり2mlの70%エチルアルコールで24時間室温にて固定後、ピンセットと手術用替刃メスにて付着筋肉と結合組織を骨から丁寧に除去した。更に、新しい70%エチルアルコールに72時間、室温にて浸漬後、大腿骨を55℃の温風発生インキュベーター（Koukensha Engineering Co., Tokyo）中にて24時間乾燥させた。乾燥骨の重量は電子天秤（Mettler AE50, Metteler Instrumente AG, Switzerland）にて測定した。投与マウスIFNの目的濃度への希釈は生理食塩水にて行った。また、試験期間中に適宜代謝ケージ（KN-645、夏目製作所、東京）にてマウス尿を採取、凍結保存した。偽手術1群には生理食塩水（大塚製薬）を、他の1群には 10^5 units /頭/回のマウスIFN- β （生理食塩水にて用時希釈）を投与した。卵巢摘出3群のうち1群には生理食塩水を、他の2群にはそれぞれ 10^3 units /頭/回、もしくは 10^5 units /頭/回のMuIFN- β を投与した。第8図は乾燥骨重量を示したものである。閉経後骨粗しょう症のモデルである卵巢摘出はマウスに骨量減少を明らかに引き起こしたが、MuIFN- β 10^5 units /頭/回の投与は正常レベルにまで骨量を回復させる効果、即ち明確な治療効果を示した。一方、偽手術群においては有意な骨量増加は 10^5 units 投与においても認められなかった。

骨コラーゲンの架橋物質である尿中D-Pyr の尿中排泄量の増減は骨コラーゲンの分解の程度、即ち骨吸収の程度を反映する優れたマーカーである事は良く知られている (C.P.Jerome et al., Bone and Mineral, 19, 117-125, 1992)。尿中D-Pyr 測定には市販測定キット (PYRILINKS - D Assay、METRA BIOSYSTEMS) を用いた。Mu I F N- β 投与4週目の成績を各実験群マウスのD-Pyr の量を尿中クレアチニン量で補正した値として第9図に示した。生理食塩水投与群では骨吸収マーカーのD-Pyr は明らかに増加したが 10^3 units / 頭 / 回および 10^5 units / 頭 / 回のMu I F N- β 投与群で共にD-Pyr 排泄量の低下、すなわち骨吸収の抑制が認められた。その抑制のレベルは偽手術群に対する生理食塩水投与レベル、すなわちほぼ正常な尿中の値と同等のレベルにまで達した。さらに第10図にはMu I F N- β 投与開始前後の体重変化を示した。図中には示していないが卵巣摘出直前 (Mu I F N- β 投与開始3週間前) のマウス体重は卵巣摘出予定群で 25.6 ± 0.18 g (n=33)、偽手術予定群で 25.7 ± 0.36 g (n=11) と同等であった。該手術後2週間経過後、すなわち図中のI F N投与開始1週間前の上記両群の体重に差が生じたが、これは卵巣摘出による体重増加 (Miyaura, C. et al., J. Bone Mineral Res., 10, 1365, 1995) を反映している。また、試験終了時の剖検においては、卵巣摘出群での著しい子宮重量の減少も確認された。これも卵巣摘出处置による典型的な反応である (Miyaura, C. et al., J. Bone Mineral Res., 10, 1365, 1995)。骨量増加という治療効果のある用量 (10^5 units / 頭 / 回) でI F N- β 投与を4週間続けても各群のマウスの体重は何等問題となる変化を示さなかった。

実施例8

マウス破骨細胞形成抑制に対する各種マウスインターフェロンの効力比較：

Mu I F N- β および γ にさらにMu I F N- α を加え、3種のマウスI F N間で効力比較をddY系マウスの骨髓細胞からの破骨細胞様細胞の形成抑制能で行った。試験方法は実施例1に従って行った。いずれのマウスI F Nとも破骨細胞様細胞の形成を抑制し、効果は γ 型、 β 型、 α 型の順に強力であった。それらの用量依存性カーブから求めたI C₅₀値は γ 型が0.1 units / ml 以下、 β 型が約0.9 units / ml であるのに対し α 型でのI C₅₀値は22.4 units / ml とな

り、 α 型の破骨細胞形成抑制作用は β に比べ約20倍、 γ 型に比べると100倍以上弱かった。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明により、 β 型IFNの相対的な骨形成促進作用が *in vitro* および動物実験で明らかになり、 β 型IFNの骨疾患治療薬および予防薬としての有用性が示された。特に、*in vivo* で β 型IFNによる骨量回復が正常骨量を有する個体よりも異常骨量を有する個体で顕著である新知見は β 型IFNの骨疾患治療薬としての産業上の利用に関し高い利点を提供するものである。

またインターフェロン誘発物質においても骨疾患治療剤としての可能性を見出し、骨疾患治療薬としての産業上の利用に関し高い利点を提供するものである。

請 求 の 範 囲

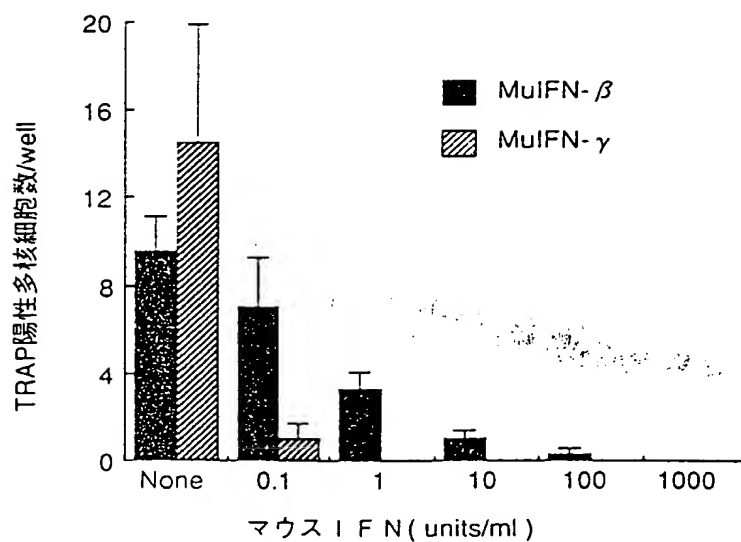
1. β 型インターフェロンまたはインターフェロン誘発物質を有効成分とする骨疾患治療薬。
2. β 型インターフェロンが天然型もしくは遺伝子組み換え型である請求の範囲第1項記載の治療薬。
3. インターフェロン誘発物質が産生するインターフェロンが α 型、 β 型または γ 型であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の治療薬。
4. 骨疾患が骨粗鬆症、腫瘍関連、代謝性、歯周病関連、または骨折である請求の範囲第1項ないし第3項記載の治療薬。
5. β 型インターフェロンまたはインターフェロン誘発物質に医薬的に許容し得る担体または希釈剤を含有した骨疾患を治療するための医薬組成物。
6. β 型インターフェロンまたはインターフェロン誘発物質の骨疾患治療剤としての使用。
7. β 型インターフェロンまたはインターフェロン誘発物質を用いることを特徴とする骨疾患の治療方法。
8. インターフェロン生産誘発能力を指標とすることを特徴として骨疾患予防あるいは治療に有効な物質を探索・評価する方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

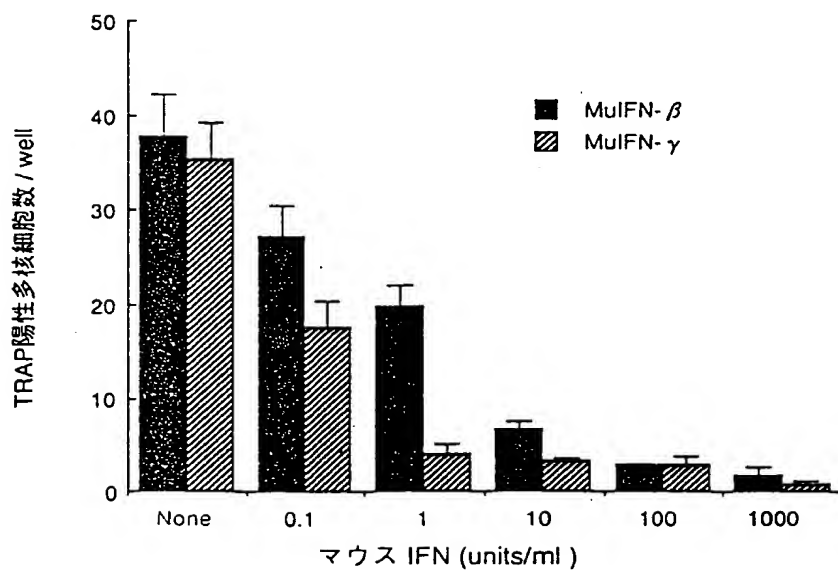
1 / 6

第 1 図



In vitro破骨細胞形成系に於けるマウス IFN による TRAP 陽性多核細胞形成に対する阻害効果。

第 2 図

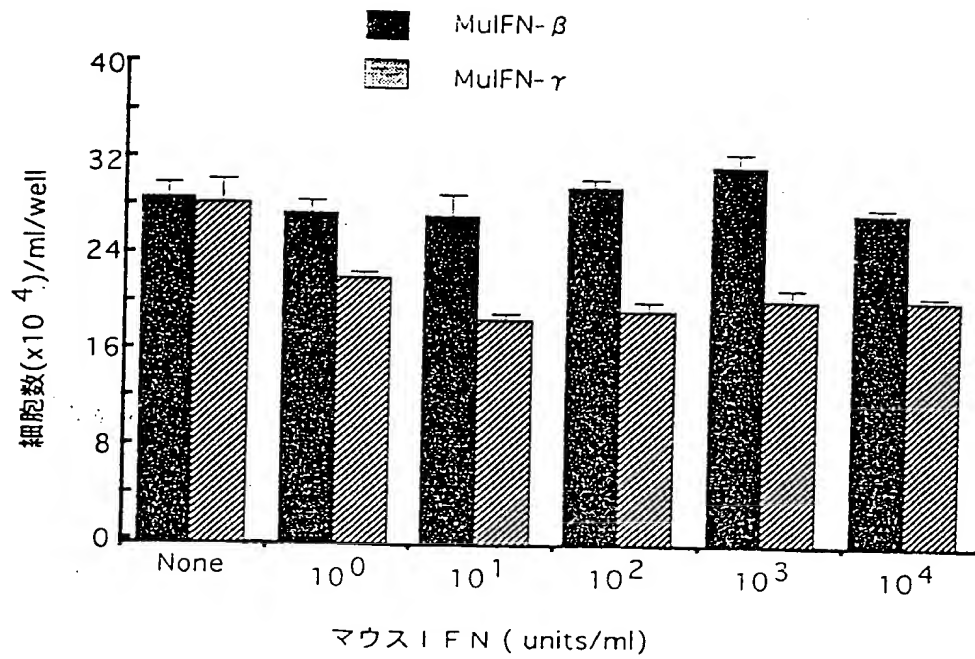


In vitro破骨細胞形成系に於けるマウス IFN による TRAP 陽性多核細胞形成に対する阻害効果。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

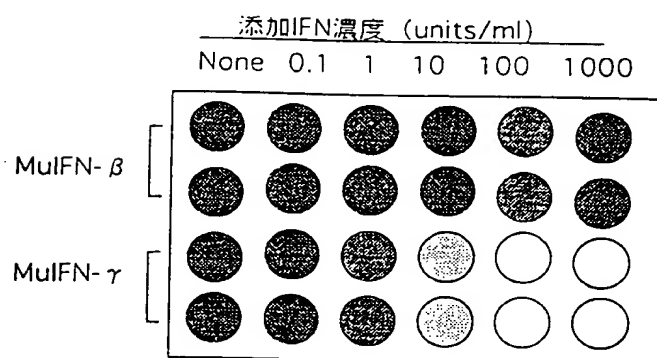
2 / 6

第3図



マウス骨芽細胞MC3T3-E1増殖に対するマウスインターフェロンの作用。

第4図

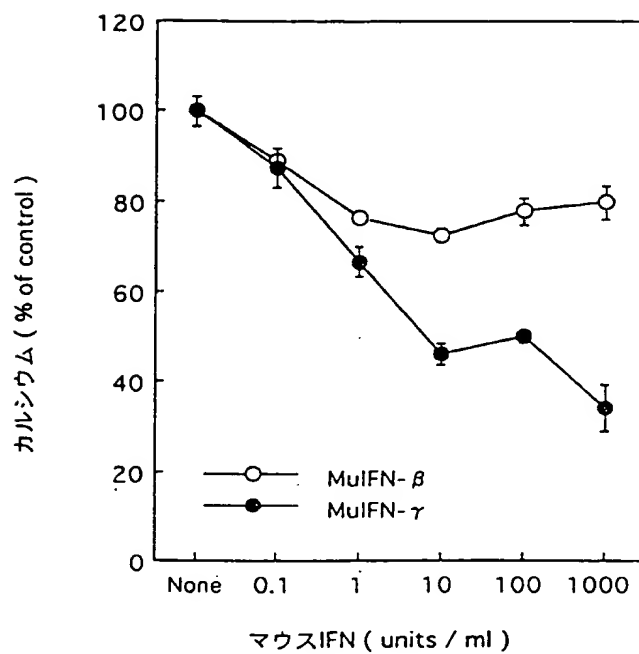


マウス骨芽細胞MC3T3-E1の石灰化に対するマウスIFNの作用。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

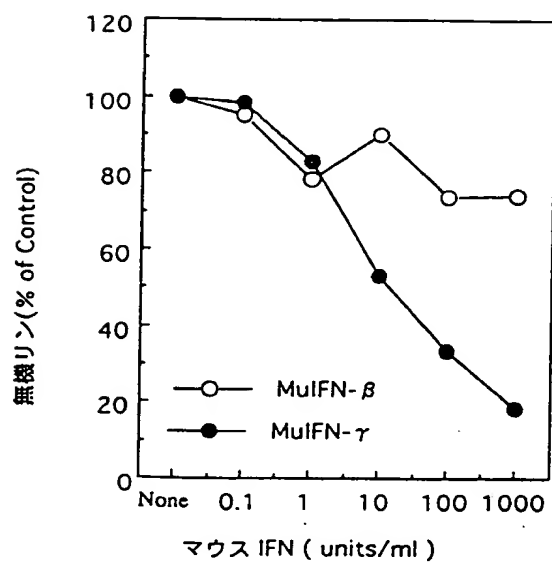
3 / 6

第 5 図



マウスIFN処理後のMC3T3-E1石灰化巣に沈着したカルシウム含量。

第 6 図

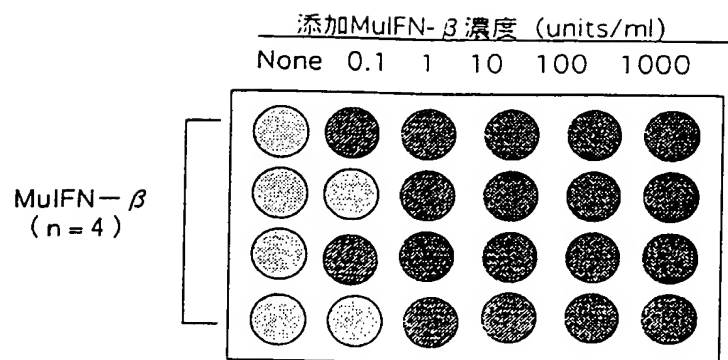


マウスIFN処理後のMC3T3-E1細胞の石灰化巣に沈着した無機リン含量。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 6

第 7 図



マウス骨芽細胞MC3T3-E1の石灰化に対するMuIFN- β の複数回投与による促進効果。

第 8 図

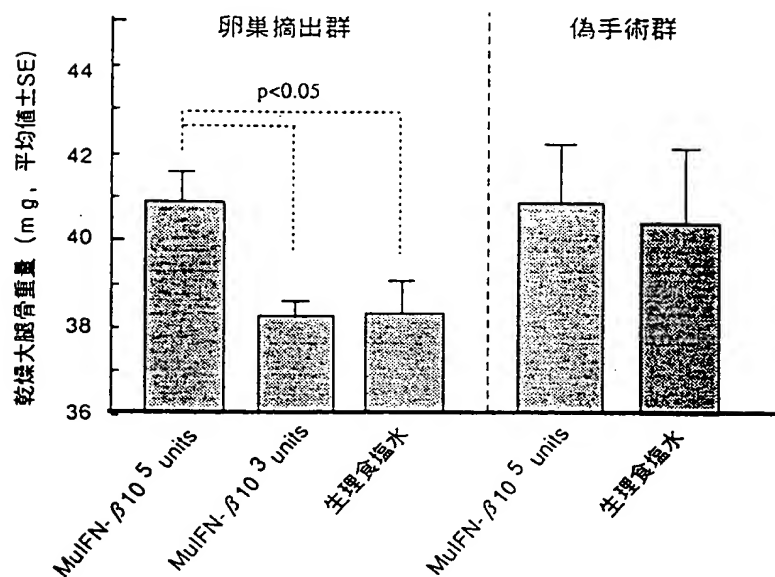


図 8 : 閉経後骨粗鬆症モデルマウスに対するMuIFN- β の治療効果

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 9 図

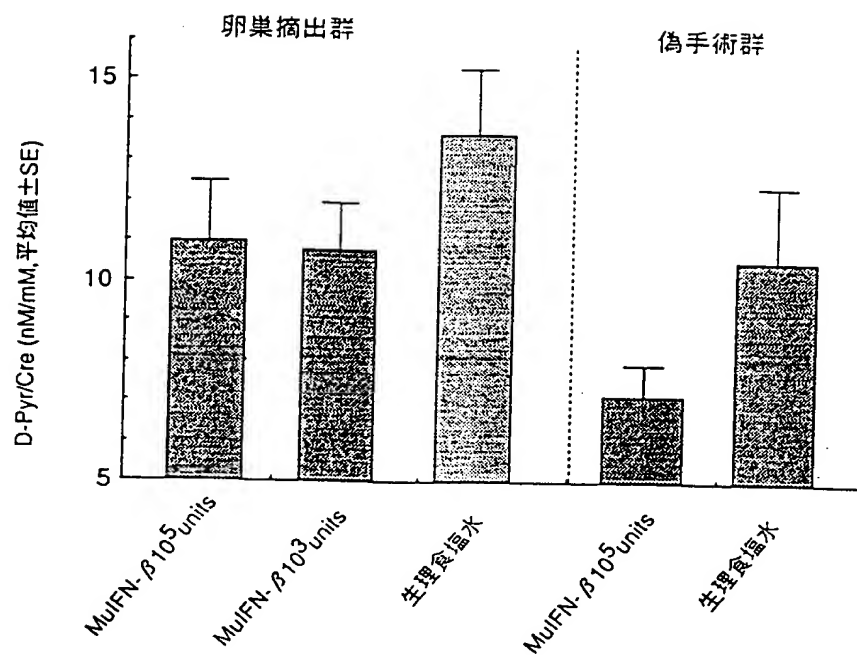
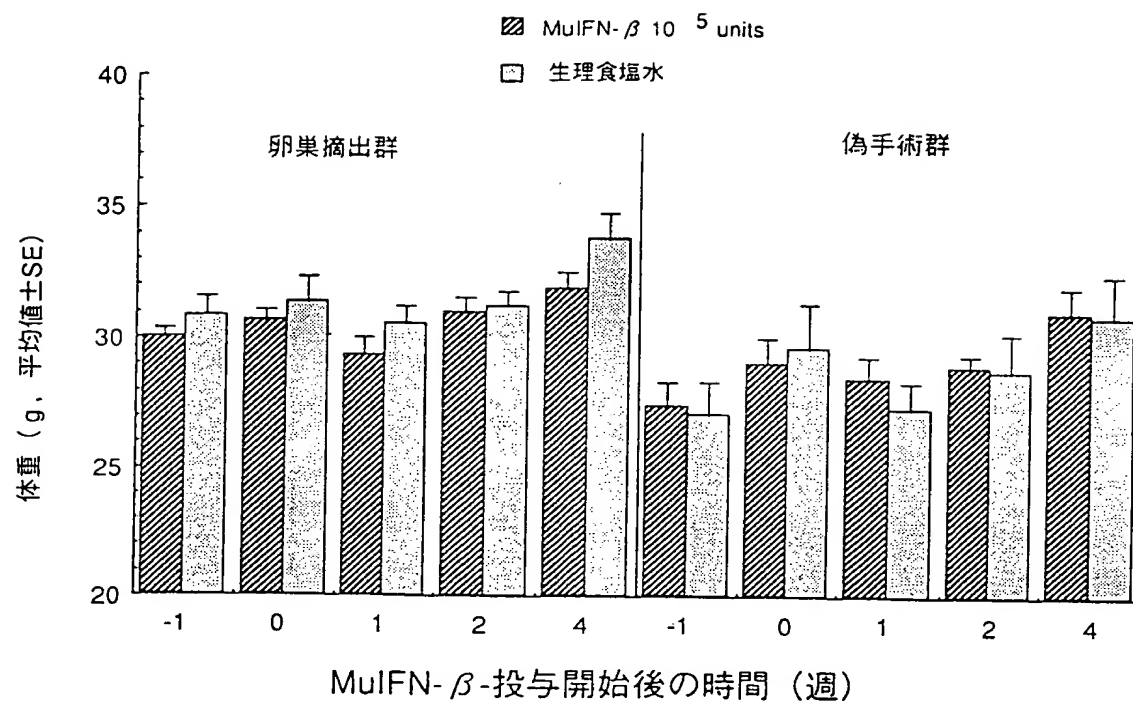


図 9：閉経後骨粗鬆症モデルマウスに於ける骨コラーゲン分解に対するマウス IFN-β の抑制効果。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第10図



骨粗鬆症モデルマウスに対するMuIFN- β 投与中のマウスの体重変化

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A61K38/21, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A61K38/21, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 62-12724, A (Boehringer Ingelheim International GmbH.), January 21, 1987 (21. 01. 87) & EP, 203580, A1 & US, 4921697, A	1-6, 8
P,X	JP, 7-215893, A (Hiroyo Morii), August 15, 1995 (15. 08. 95) (Family: none)	1-6, 8
A	Calcified Tissue International, Vol. 53 Suppl. 1 (1993) G. David Roodman, "Role of Cytokines in the Regulation of Bone Resorption" S94-S98	1-6, 8
A	Gerontology, Vol. 35 (1989) Shunichi Shiozawa, et al., "Radioimmunoassay of Circulating Alpha- Interferon with Reference to Aging and Osteoporosis", p. 305-310	1-6, 8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 18, 1996 (18. 10. 96)

Date of mailing of the international search report

October 29, 1996 (29. 10. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02099

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A 6 1 K 3 8 / 2 1, A 6 1 K 4 5 / 0 0

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A 6 1 K 3 8 / 2 1, A 6 1 K 4 5 / 0 0

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C A S O N L I N E

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6 2 - 1 2 7 2 4, A (ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテルハフツング) 2 1. 1 月. 1 9 8 7 (2 1. 0 1. 8 7) & E P, 2 0 3 5 8 0, A 1 & U S, 4 9 2 1 6 9 7 , A	1 - 6, 8
P, X	J P, 7 - 2 1 5 8 9 3, A (森井浩世) 1 5. 8 月. 1 9 9 5 (1 5. 0 8. 9 5) (ファミリーなし)	1 - 6, 8
A	Calcified Tissue International, Vol. 53 Suppl. 1 (1993) G. David Roodman, "Role of Cytokines in the Regulation of Bone Resorption" S94-S98	1 - 6, 8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8. 1 0. 9 6

国際調査報告の発送日

29.10.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬 下 浩 一

4 C

9 4 5 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 3

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gerontology, Vol. 35 (1989) Shunichi Shiozawa, et al., "Radioimmunoassay of Circulating Alpha-Interferon with Reference to Aging and Osteoporosis" , p. 305-310	1 - 6 , 8

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの1の続き)

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 7 は、治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、P C T 17 条(2)(a)(i)及び P C T 規則
39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に
従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)